

AUS DEM INSTITUT FÜR HUMANGENETIK
KLINIKUM DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Direktorin: Prof. Dr. med. Ortrud Steinlein

Untersuchungen zu zwei genregulatorischen
Elementen: uORFs im zellulären Stressmodell und
microRNAs bei Triple-negativem Brust-, sowie
Darmkrebs und Sepsis

KUMULATIVE HABILITATIONSSCHRIFT

vorgelegt von

Dr. med. vet. Marlene Reithmair

2019

Inhaltsverzeichnis

1 Hintergrund	2
2 Zielsetzung der Habilitation	3
3 Untersuchungen	3
Auswirkungen von uORFs des Cannabinoid-, Glukokortikoid-, und Mineralokortikoidrezeptor auf die Proteinexpression unter verschiedenen Stressfaktoren	3
Zelluläre und exmiRNA-Profile von Triple negativen Brustkrebszelllinien unter Glukokortikoidrezeptor-Überexpression	6
Methodische Optimierung der Isolation von extrazellulären Vesikeln für die Charakterisierung des vesikulären miRNA-Profiles aus Blut	8
Zelluläre, Serum- und exmiRNA-Profile bei Sepsispatienten	14
Einfluss des Anästhetikums auf das miRNA-Profil bei Patienten mit Kolonkarzinom-Resektion	15
4 Zusammenfassung und Ausblick	18
5 Literaturverzeichnis	19
6 Publikationsverzeichnis	22
Originalarbeiten als Erst- oder Letztautorenschaften	22
Originalarbeiten als Koautor	22
Case reports	23
Sonstige Veröffentlichungen	23
7 Verzeichnis der relevanten Publikationen für die Habilitationsleistung	24

1 Hintergrund

Die Expression von proteinkodierenden Genen kann durch verschiedenste Elemente posttranskriptionell reguliert werden. Zu diesen genregulatorischen Elementen gehören beispielsweise sogenannte internal ribosomal entry sites, iron-responsive elements und upstream open reading frames (uORFs). Sie sind meist in der 5' nicht translatierten Region (5'-UTR) lokalisiert und liegen somit direkt vor dem proteinkodierenden Gen, dessen Expression sie regulieren⁸. Andere genregulatorische Elemente, wie lange nicht kodierende RNAs (lncRNAs) und microRNAs (miRNAs), werden ebenfalls von nicht proteinkodierenden Genomregionen (z.B. intronischen Bereichen) transkribiert, können jedoch ihre Wirkung über Bindungsstellen in der 3'UTR multipler proteinkodierender Gene ausüben^{1,2}. In dieser Habilitationsschrift liegt der Fokus auf den genregulatorisch wirksamen Elementen uORFs und miRNAs, die nachfolgend detaillierter beschrieben werden.

Upstream open reading frames

Upstream open reading frames (uORFs) gehören zu den *cis*-regulatorischen Elementen im Genom und sind bei vielen Genen dem für die Proteinsynthese relevanten *open reading frame* vorgeschaltet. Besonders häufig finden sich uORFs in Onkogenen und anderen, für Zellwachstum und –differenzierung wichtigen Genen. Die uORFs sind definiert über ein Start- und ein *in frame* liegendes Stoppcodon in der 5'-nicht translatierten Region (5'-UTR) eines Gens. Über mehrere Mechanismen können uORFs als genregulatorische Elemente die Effizienz der Proteinexpression beeinflussen. Unter anderem können sie die Geschwindigkeit der Translation beeinflussen, zum anderen können auch funktionelle uORF-Peptide gebildet werden, die die Translation des Haupt-ORFs beeinflussen. Basenpolymorphismen, sogenannte single nucleotide polymorphisms (SNPs), können durch Austausch einer Base in der 5'-UTR zu neuen Start- und Stoppcodons und somit zu neuen uORFs führen, oder vorhandene entfernen (polymorphe uORFs). *In silico* Analysen ergaben, dass fast 50% der humanen Transkripte uORFs beinhalten, wovon schon für mehrere eine Reduktion der Proteinexpression um bis zu 60% experimentell bestätigt werden konnte⁷. Insbesondere scheinen uORFs eine Möglichkeit des Organismus zu sein, auf interne oder umweltbedingte Stresszustände adäquat reagieren zu können. So konnte bereits eine genregulatorische Wirkung von uORFs verschiedener Gene (z.B. *ATF4* und *GADD34*), die eine Rolle bei der zellulären Stressantwort spielen, gezeigt werden^{12,16}. Da auch das Endocannabinoid- und Glukokortikoidsystem entscheidend bei Stresszuständen des Organismus involviert sind, liegt die Vermutung nahe, dass uORFs des Cannabinoid-, Glukokortikoid-, sowie Mineralokortikoidrezeptors unter Stress genregulatorisch wirksam sind.

microRNAs und extrazelluläre Vesikel als ihre Transportvehikel

Ein weiteres genregulatorisches Element stellen microRNAs (miRNAs) da. Genauer gesagt spielen miRNAs als kleine, 19-25 Basepaar lange Nukleinsäuren eine Rolle bei der posttranskriptionellen Genregulation. Sie binden spezifisch über ihre sog. Seed-Sequenz komplementär an die 3'-nicht translatierte Region (3'-UTR) von mRNAs und inhibieren dadurch deren Proteintranslation bzw. führen zum Abbau der gebundenen mRNA. Von den mittlerweile über 2000 bekannten humanen miRNAs, kann einerseits jede einzelne mehrere verschiedene mRNAs als Zielobjekt haben. Andererseits können auch unterschiedliche miRNAs die mRNA-Expression eines spezifischen Gens gleichzeitig beeinflussen^{14,18}. Interessanterweise fand man miRNAs nicht nur intrazellulär, sondern auch extrazellulär – sie können somit als Signalmoleküle zwischen den Zellen, insbesondere über die Blutzirkulation, transportiert werden. Hierfür werden jedoch Transportvehikel benötigt, da ungeschützte RNA schnell enzymatisch abgebaut wird. Im Jahr 2007 entdeckte man, dass bestimmte extrazelluläre Vesikel (ECVs),

insbesondere Exosomen mit einer Größe von ca. 40-150 nm, Nukleinsäuren wie lange nicht kodierende RNA (lncRNA), miRNA und mRNA beinhalten und von Empfängerzellen internalisiert werden können¹⁹. Es konnte sogar nachgewiesen werden, dass der Inhalt dieser ECVs (Proteine, Nukleinsäuren, Lipide) in der Zielzelle funktionell wirksam ist. Interessanterweise ist das ECV-RNA-Profil nicht mit der zellulären RNA der ECV-produzierenden Zelle identisch. Dies weist darauf hin, dass diese ECVs als gezielte interzelluläre Kommunikationsmittel dienen. Die Tatsache, dass Zellen untereinander über solche ECVs kommunizieren können, ist ein noch wenig verstandener Mechanismus, der sich erheblich von den „klassischen“ Informationswegen wie beispielsweise Protein-Rezeptorinteraktionen unterscheidet. Mittlerweile ist bekannt, dass nahezu jeder Zelltyp imstande ist ECVs freizusetzen und diese sich somit in sämtlichen Körperflüssigkeiten wie Blut, Urin, Muttermilch, Speichel und Samenflüssigkeit wiederfinden. Da das ECV-Profil eine Reflektion der physiologischen und pathologischen Zustände der produzierenden Zelle darstellt, kann auf diesen Wegen die Information über physiologische und pathologische Zellveränderungen wie Entzündung oder Tumorgeschehen zielgerichtet weitergegeben werden. Auf diese Weise können die in diesen ECVs verpackten kleinen miRNAs (exmiRNAs) den Zellstoffwechsel der Empfängerzelle als genregulatorische Elemente beeinflussen. Aufgrund dieser Eigenschaften stellen exmiRNAs leicht zugängliche, vielversprechende diagnostische und prognostische Biomarker-Kandidaten für verschiedenste Krankheitsbilder dar^{13,20}. Wenn es gelingt, die komplexen miRNA-mRNA-Interaktionen und die damit verbundenen krankheitsspezifischen Signalkaskaden zu entschlüsseln, könnten miRNAs neue therapeutische Möglichkeiten eröffnen. Das Forschungsgebiet der biologischen Funktion von ECVs ist allerdings noch relativ jung, so dass noch Vieles unverstanden und aufzuklären ist.

2 Zielsetzung der Habilitation

Die vorliegende Habilitationsarbeit beschäftigte sich mit zwei Arten genregulatorisch wirksamer Elemente, uORFs und miRNAs, bei verschiedenen pathophysiologischen Zuständen. Zum einen wurden in der 5'-UTR liegende uORFs des Cannabinoid- sowie des Glukokortikoid- und Mineralokortikoidrezeptors in einem Stressmodell auf ihre Funktionalität untersucht. Zum anderen wurden sowohl in Triple negativen Brustkrebszelllinien, als auch bei Kolonkarzinom- und Sepsispatienten mit besonderem Augenmerk auf vesikuläre miRNAs (exmiRNAs), krankheitsspezifische miRNA-Profile erstellt, die als prognostische und/oder diagnostische Biomarker bei diesen kritisch kranken Patientengruppen dienen können. Für die miRNA-Analysen aus ECVs des Bluts bedurfte es zunächst einer methodischen Optimierung der ECV-Gewinnung um ein schnelles, klinisch praktikables Verfahren zu erhalten, das eine bestmögliche Extraktion und Analyse des ECV-miRNA-Profils unter klinischen Bedingungen erlaubt.

3 Untersuchungen

Auswirkungen von uORFs des Cannabinoid-, Glukokortikoid-, und Mineralokortikoidrezeptor auf die Proteinexpression unter verschiedenen Stressfaktoren

In silico Analysen ergaben, dass fünf verschiedene Varianten des Cannabinoidrezeptor-Gens (*CNR1*) existieren, wovon vier potentiell funktionelle uORFs in ihrer 5'-UTR besitzen (Abb. 1). Die 5'-UTR des Glukokortikoidrezeptor-Gens (*NR3C1*) beinhaltet drei potentiell funktionelle uORFs, wobei das erste durch einen Polymorphismus ein Startcodon generiert. Im Gen des Mineralokortikoidrezeptors (*NR3C2*) wurde ein uORF gefunden (Abb. 2).

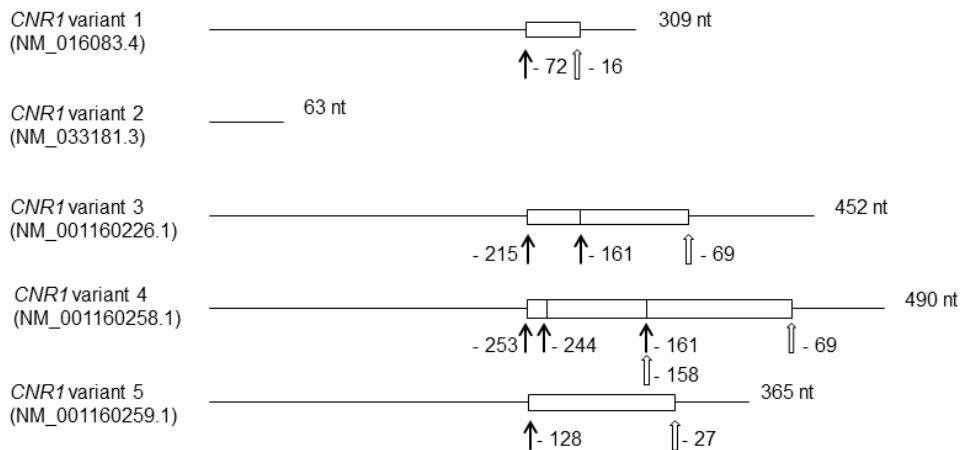


Abb. 1:
Schema der *in silico* identifizierten uORFs der fünf CNR1-Varianten mit Länge der 5'-UTR (nt: Nukleotid) und Start-, Stoppcodonposition.

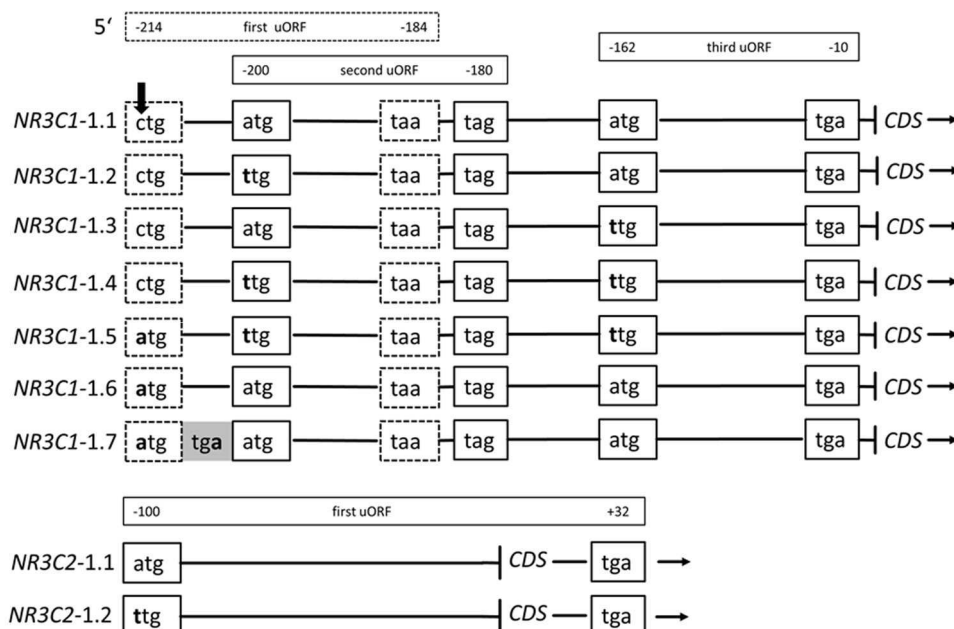


Abb. 2:
Schema der *in silico* identifizierten uORFs des NR3C1 und NR3C2 (NR3C1-1.1; NR3C2-1.1), sowie die Konstrukte mit ausgeschalteten uORFs (NR3C1-1.2-1.7; NR3C2-1.2) (CDS: kodierende Sequenz).

Um die uORFs auf ihre Funktionalität zu untersuchen, wurde die jeweilige 5'-UTR vor die Sequenz der Fireflyluziferase kloniert. Durch gezielte Mutagenese wurden zudem Konstrukte hergestellt, bei denen das Startcodon ATG der jeweiligen uORFs durch Basenaustausch (TTG) ausgeschaltet wurde. Humane Zellen wurden mit diesen Konstrukten unter folgenden vier Bedingungen kultiviert:

- 1) Physiologisch: 37°C und 5% CO₂ für 24h
- 2) Hypoxie: 37°C und 95% Stickstoff, 5% CO₂ für 24h
- 3) Ohne Glukose: Zellkulturmedium ohne Glucose, 37°C und 5% CO₂ für 24h
- 4) Hyperthermie: 41°C und 5% CO₂ für 24h

Anschließend wurde ein Luziferase-Assay durchgeführt. Hierbei wird die Fireflyluziferase-Sequenz des Vektors von der Zelle in ein aktives Firefly-Enzym translatiert, das sein Substrat Luziferin spaltet,

wobei Licht emittiert wird. Dieses kann mittels Luminometer quantifiziert werden, was Rückschlüsse auf die Enzymmenge erlaubt. Sind die vor der Fireflyluziferase-Sequenz liegenden uORFs funktionell wirksam, so ergibt der Vergleich des jeweiligen Konstrukts mit angeschaltetem versus ausgeschaltetem Startcodon eine Reduktion der Lumineszenz, was einer Reduktion der Enzymmenge entspricht.

Die Untersuchungen der uORFs des *CNR1*-Gens zeigten für die Variante 3 und 4 Veränderungen der Proteinexpression (Abb. 3 und 4). Folglich sind diese uORFs fähig, die *CNR1*-Expression unter zellulären Stresszuständen zu beeinflussen. Die Ergebnisse hinsichtlich der drei uORFs des Glukokortikoidrezeptors ergaben eine signifikante Proteinreduktion durch das angeschaltete polymorphe uORF für die Bedingungen 1) -3) (Abb. 5). Das uORF des Mineralokortikoidrezeptors beeinflusste bei keiner der vier getesteten Bedingungen die Proteinexpression und scheint daher nicht funktionell wirksam zu sein^{11,15}.

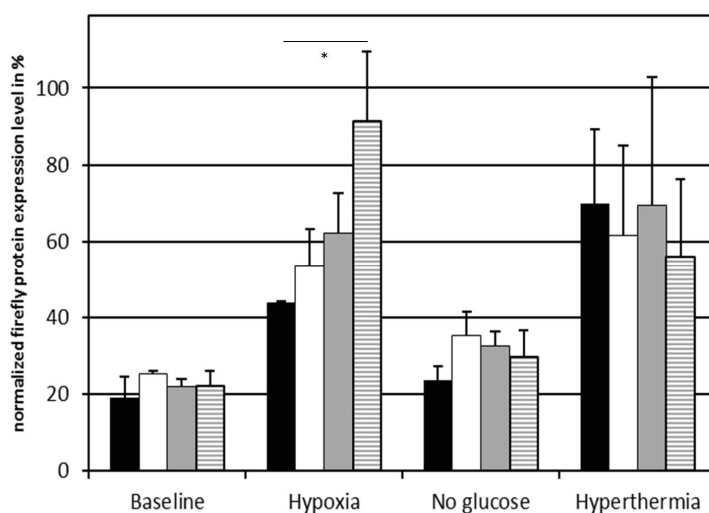


Abb. 3:
Luziferase Assay der Cannabinoidrezeptor-Variante 3 zeigte eine signifikante Proteinexpressionssteigerung unter Hypoxiebedingung ($p < 0.05$). Von links nach rechts: Wildtyp (schwarz), 1. uORF ausgeschaltet (weiß), 2. uORF ausgeschaltet (grau), beide uORFs ausgeschaltet (gestrichelt).

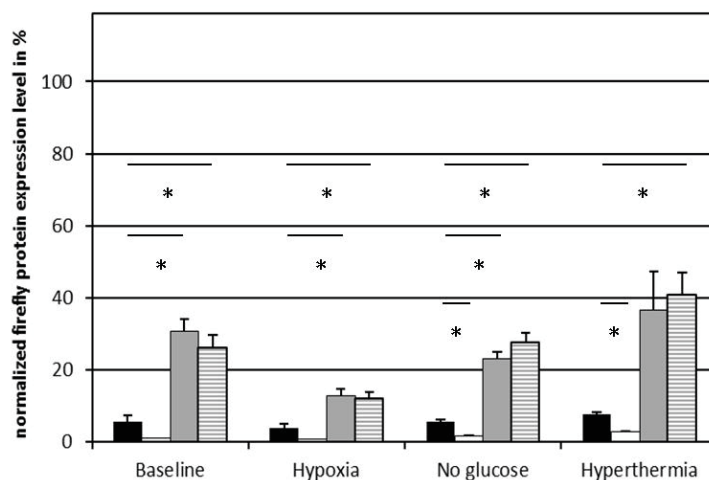


Abb. 4:
Luziferase Assay der Cannabinoidrezeptor-Variante 4 zeigte eine signifikante Proteinexpressionsänderung für alle vier Bedingungen ($p < 0.05$). Von links nach rechts: Wildtyp (schwarz), 1. uORF ausgeschaltet (weiß), 2. uORF ausgeschaltet (grau), beide uORFs ausgeschaltet (gestrichelt).

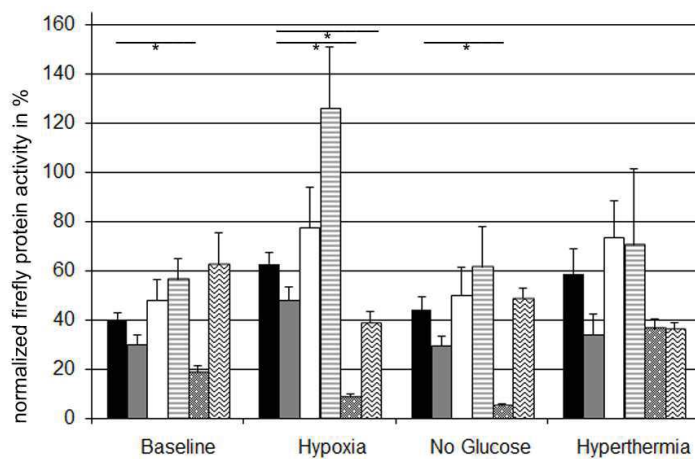


Abb. 5:
Luziferase Assay des Glukokortikoidrezeptors zeigte eine signifikante Proteinexpressionsreduktion für die ersten drei Bedingungen durch das angeschaltete polymorphe uORF ($p < 0.05$). Von links nach rechts: NR3C1-1.1 bis NR3C1-1.6.

Zelluläre und exmiRNA-Profile von Triple negativen Brustkrebszelllinien unter Glukokortikoidrezeptor-Überexpression

Triple negativer Brustkrebs (TNBC) ist als besonders aggressiver Brustkrebstyp bekannt. Neuere Untersuchungen zeigten, dass TNBC, welcher einen gesteigerten Glukokortikoidrezeptor-Expression aufweist, mit einer erhöhten Therapieresistenz, sowie einer erhöhten Rückfall- und Mortalitätsrate assoziiert ist⁹. Neben der Regulation von proteinkodierenden Genen kann der Glukokortikoidrezeptor auch die Expression von miRNAs beeinflussen. Daher wurde in diesem Projekt untersucht, welche zellulären miRNAs und exmiRNAs in TNBC einer Regulation durch den Glukokortikoidrezeptor unterliegen. Es wurden mittels speziell für kleine RNAs adaptierter Hochdurchsatz-Sequenzierung (Small-RNA-Seq) von drei verschiedenen TNBC Zelllinien unter Glukokortikoidrezeptor-Überexpression miRNA-Profile erstellt.

Hierfür wurden drei TNBC Zelllinien (MDA-MB-231, MDA-MB-436 und MDA-MB-468) mit einem Plasmid transfiziert, das die Sequenz des Glukokortikoidrezeptors-Transkripts trägt. Nicht transfizierte Zellen wurden als Kontrollen verwendet. Von jeder Zelllinie wurden drei unabhängige technische Replikate untersucht.

Um zunächst die Effektivität der Glukokortikoidrezeptor-Expression zu evaluieren, wurden die mRNA-Level mittels RT-qPCR (reverse transcription quantitative real-time PCR) gemessen. Zusätzlich wurden von drei Glukokortikoidrezeptor-regulierten Genen (*DUSP1*, *SGK1* und *GILZ*) ebenfalls die mRNA-Level quantifiziert. Die Normalisierung erfolgte mit dem Referenzgen *GAPDH*.

Die RT-qPCR zeigte in den transfizierten Zellen eine signifikant gesteigerte Glukokortikoidrezeptor-Expression (MDA-MB-231: fold change=111.43, $p=1.75E-4$, MDA-MB-436: fold change=172.45, $p=2.51E-4$ und MDA-MB-468: fold change=335.45, $p=6.39E-6$) (Abb. 6A). Die Expressionslevel von *DUSP1*, *SGK1* und *GILZ* waren ebenfalls signifikant hochreguliert (nur die *GILZ*-Expression in MDA-MB-468 war nicht signifikant verändert) (Abb. 6B-D). Somit konnte eine erfolgreiche Transfektion der Zellen mit dem Glukokortikoidrezeptor und insbesondere auch dessen Expression bestätigt werden.

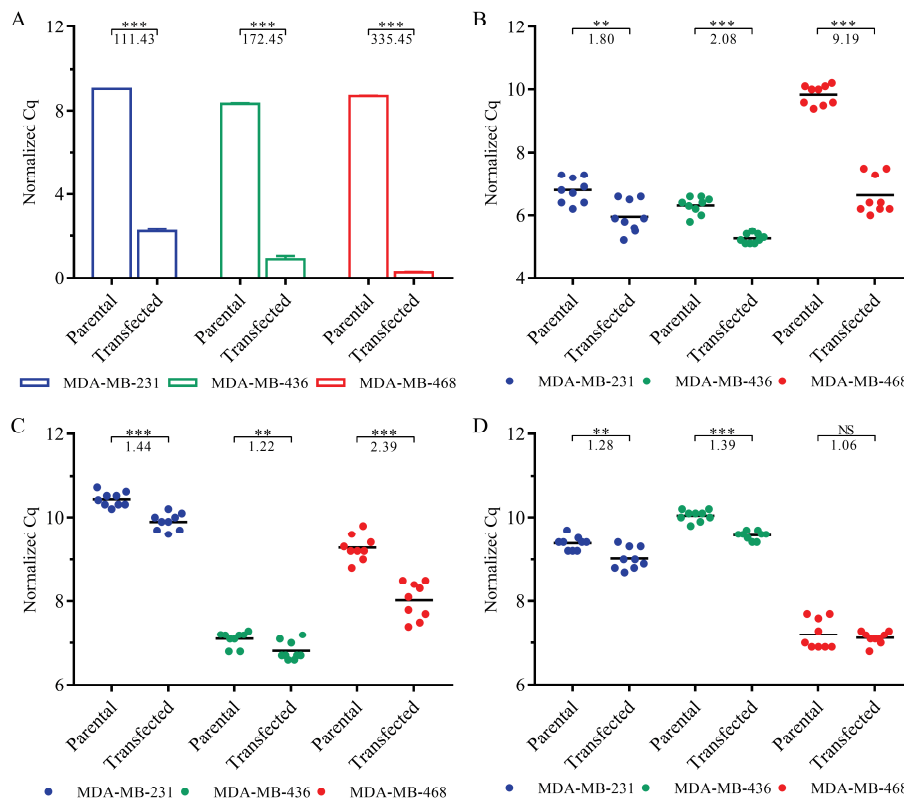


Abb. 6:
 A):mRNA-Level
 des Gluko-
 kortikoid-
 rezeptors
 B) mRNA-Level
 des Gens
DUSP1
 C) mRNA-Level
 des Gens *SGK1*
 D) mRNA-Level
 des Gens *GILZ*
 * p<0.05;
 ** p<0.01;
 *** p<0.001;
 NS: nicht signi-
 fikant

Die Isolation der ECVs aus den Zelllinien MDA-MB-231 und MDA-MB-468 erfolgte mit dem miRCURY Exosome Isolation Kit (Exiqon). Mittels Nanopartikel-Tracking-Analyse (NTA) wurde die durchschnittliche Partikelgröße bestimmt. Für die Zelllinie MDA-MB-231 bzw. MDA-MB-468 wurde ein durchschnittlicher Durchmesser von 119 ± 74.4 bzw. 140 ± 116.7 nm ermittelt (Abb. 7).

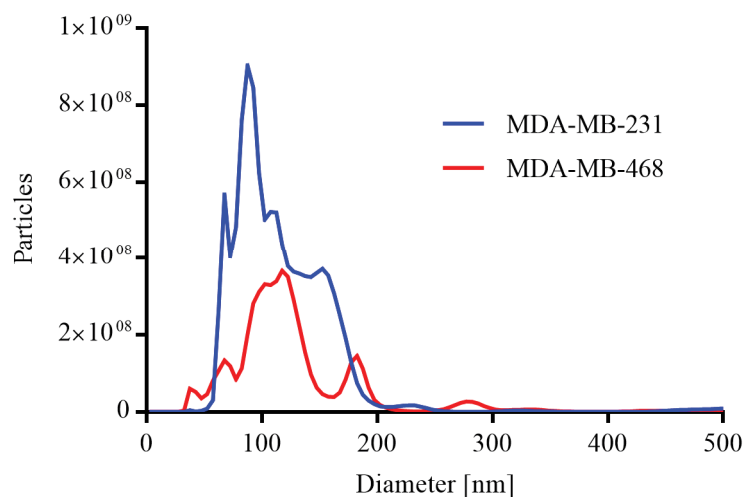


Abb. 7:
 Partikelgrößen-
 Verteilung in ECV-
 Isolaten von den Zell-
 linien MDA-
 MB-231 und MDA-
 MB-468

Für beide Zelllinien wurden die SmallRNA-Seq Daten der exmiRNAs mittels differentieller Genexpression (DGE) analysiert. Hierfür wurden jeweils die Daten der transfizierten Zellen mit den Kontrollen

verglichen. Beim Vergleich der exmiRNA-Datensätze ergaben sich für keine der beiden Zelllinien signifikante Unterschiede hinsichtlich endogener (Kontrollen) und Glukokortikoidrezeptor-überexprimierter (transfizierter) Zellen.

Die DGE aller drei Zelllinien für zelluläre miRNA führte zu signifikanten Expressionsänderungen einzelner miRNAs (Tabelle 1).

	miRNA	log2FC	p-adj
	miR-221-5p	1.13	0.0010
MDA-MB-231	miR-576-3p	1.11	0.0071
	let-7b-3p	-1.10	0.0118
	miRNA	log2FC	p-adj
MDA-MB-436	miR-203a-3p	1.35	0.0301
	miR-4746-5p	-1.07	0.0444
	miRNA	log2FC	p-adj
MDA-MB-468	miR-1260a	-1.54	0.0003
	miR-1260b	-1.54	0.0001

Tabelle 1: Zelluläre miRNAs, die bei Glukokortikoidrezeptor-Überexpression signifikant reguliert sind. Positiver Fold change bedeutet eine gesteigerte miRNA Expression unter Glukokortikoidrezeptor-Überexpression.

Log2FC: log2 Fold change

p-adj: adjustierter p-Wert

Diese sieben zellulären miRNAs wurden anschließend mittels RT-qPCR einer Validierung unterzogen. Hierbei zeigte nur miR-203a-3p weiterhin einen signifikanten Expressionsunterschied.

Um eine biologische Wirkung durch die miR-203a-3p-Expressionsänderung zu untersuchen, wurden mRNA-Level von vier miR-203a-3p potentiell regulierten Genen bestimmt (*MYLK*, *ACTG2*, *CNN1* und *HLA-DPB1*). Die RT-qPCR Daten ergaben für die *MYLK* Expression eine dreifache Steigerung. Die mRNA-Level der anderen drei Gene zeigte keine signifikante Änderung im Vergleich von Kontrollen und transfizierten MDA-MB-436 Zellen.

Zusammenfassend legen die Ergebnisse dieser Untersuchungen die Schlussfolgerung nahe, dass der Glukokortikoidrezeptor das miRNA-Profil nur in geringem Maße beeinflusst. Die einzig signifikante und in diesem Datensatz validierbare zelluläre miRNA miR-203a-3p wurde nur spezifisch in einer Zelllinie gefunden. Die Untersuchungen der exmiRNAs ergaben keine signifikanten miRNA-Expressionsänderungen. Folglich weisen diese Daten daraufhin, dass miRNA-Expressionsänderungen nicht ursächlich für die Therapieresistenz und erhöhte Mortalitätsrate bei TNBC mit Glukokortikoidrezeptor-Überexpression sein können³.

Methodische Optimierung der Isolation von extrazellulären Vesikeln für die Charakterisierung des vesikulären miRNA-Profiles aus Blut

Als Goldstandard für die Isolation von ECVs ist die Ultrazentrifugation (UZ) anerkannt. Jedoch ist dieses Verfahren zeitaufwändig und für kleine Volumina nur bedingt geeignet. In den letzten Jahren kamen daher mehrere kommerzielle Isolationskits auf den Markt, die eine optimale ECV-Isolation aus den verschiedensten biologischen Flüssigkeiten (Serum, Urin, Zellüberstand) versprechen. In einem

ersten Projekt wurden vier kommerzielle ECV-Isolationskits mit dem Goldstandard UZ verglichen. Ziel dieser Versuche war es eine für Serum als Ausgangsmaterial optimale ECV-Isolationsmethode zu finden, die eine bestmögliche Ausbeute an exmiRNAs bei kritisch kranken Patienten für die Hochdurchsatzsequenzierung (SmallRNA-Seq) liefert. Hierfür wurde je 1 ml Serum von neun Patienten (vier Sepsispatienten, sowie fünf Patienten mit Septischem Schock) und zehn gesunden Freiwilligen gewonnen. Verglichen wurden folgende ECV-Isolationsprinzipien:

Präzipitation: Dieses Verfahren beruht auf der Entziehung der Hydrathüllen der ECVs in einem Puffersystem, so dass die ECVs ausfallen und nach der Zentrifugation als Pellet vorliegen (miR-CURY Exosome Isolation Kit (Exiqon)).

Gelpermeationschromatographie (auch Größenausschlusschromatographie genannt): Dieses Verfahren trennt in einer mit porösem Gel gefüllten Säule Partikel nach ihrer Größe auf. Kleine Moleküle dringen in die Poren des durch Puffer gequollenen Gels und bewegen sich dann langsam mittels Diffusion durch die Säule. Große Moleküle dagegen passieren die Gelsäule am schnellsten, da sie nicht in die Poren dringen können (Exo-spin (Cell Guidance System); qEV (Izon Science)).

Membranaffinität: Hierbei werden die ECVs über biochemische Wechselwirkungen an eine Membran gebunden und mit einem geeigneten Puffer anschließend von der Membran gewaschen. Dabei ist die ECV-Isolation sowohl unabhängig von der ECV-Größe, als auch von Epitopeigenschaften auf der ECV-Oberfläche (exoRNeasy (Qiagen)).

Sedimentation: Dieses Prinzip liegt der Ultrazentrifugation zu Grunde. Standardmäßig wird für die ECV-Gewinnung die sogenannte differentielle Ultrazentrifugation angewandt. Zunächst wird mit niedriger Geschwindigkeit (12 000g für 1h) zentrifugiert um größere Moleküle zu sedimentieren. Anschließend wird der gewonnene Überstand mit hoher Geschwindigkeit (120 000g für 14h) zur Pelletierung der ECVs zentrifugiert.

Um die gewonnenen ECVs hinsichtlich ihrer Quantität und Qualität zu untersuchen, wurden die Nanopartikel-Tracking-Analyse (NTA), die Transmissions-Elektronenmikroskopie (TEM) und der Westernblot verwendet (WB).

NTA: Mittels NTA kann die Menge und Größenverteilung der gewonnenen ECVs bestimmt werden. Hierfür wurde der NanoSight LM10 (Malvern Instruments GmbH) verwendet. Die Methode berechnet anhand der Brown'schen Bewegung, sowie der Lichtstreuung der Moleküle deren Größe und Konzentration. Hierbei wird das Licht des Laserstrahls gestreut, sobald es auf die Oberfläche eines Moleküls trifft, was wiederum durch ein Mikroskop vergrößert und mittels Kamera visualisiert wird. Eine spezielle Software zeichnet die Brown'schen Bewegungsmuster einzelner Moleküle auf und berechnet auf dieser Basis deren hydrodynamischen Durchmesser.

TEM: Dieses Bildgebungsverfahren ermöglicht die Visualisierung einzelner ECVs, um so deren Größe und Intaktheit zu bestimmen. Zudem lässt die bildliche Auflösung Strukturen der Moleküle erkennen, so dass eine Unterscheidung von Vesikeln zu anderen ähnlich großen Molekülen (Lipoproteinen) möglich wird.

WB: Mittlerweile werden einige ECV-Proteinmarker zur ECV-Identifizierung und Charakterisierung herangezogen. Tetraspanine wie CD9, CD63 und CD81 sind häufig auf der ECV-Oberfläche zu finden.

Als cytosolische ECV-Marker gelten u.a. Syntenin und TSG101. Allerdings gibt es keinen ubiquitär vorkommenden ECV-Marker, sondern eine Kombination verschiedener Marker findet sich je nach ECV-Subtyp wieder, weshalb auch hier mehrere ECV-Proteinmarker eingesetzt wurden.

Da keine der drei ECV-Charakterisierungsmethoden für sich allein ausreicht um sicher ECVs als solche zu identifizieren, erfolgt die ECV-Bestimmung standardmäßig anhand der Auswertungen aller drei Methoden. Im NTA zeigte sich für das Präzipitationsverfahren (miRCURY) die kleinste Größenverteilung mit durchschnittlich 104.46 ± 11.96 , für das Membranaffinitäts-Prinzip (exoRNeasy) die größte mit 202.86 ± 10.70 , jeweils bei gesunden Probanden. Die Größenverteilung aus den Proben der Sepsispatienten wies bis auf das Gelpermeationsverfahren (qEV) ein geringfügig breiteres, jedoch nicht signifikantes, Intervall auf. Mit dem Präzipitationsverfahren (miRCURY) konnten im NTA die größte Zahl an Partikeln gemessen werden; an zweiter Stelle lag das Gelpermeationsverfahren (qEV und Exo-spin), gefolgt von dem Sedimentations- (UC) und dem Membranaffinitätsverfahren (exoRNeasy) (Abb. 8). Anzumerken ist jedoch, dass das NTA nicht Vesikel von anderen Molekülen (Proteinen, Lipiden) ähnlicher Größe unterscheidet, so dass die Anzahl an ECVs überschätzt werden kann.

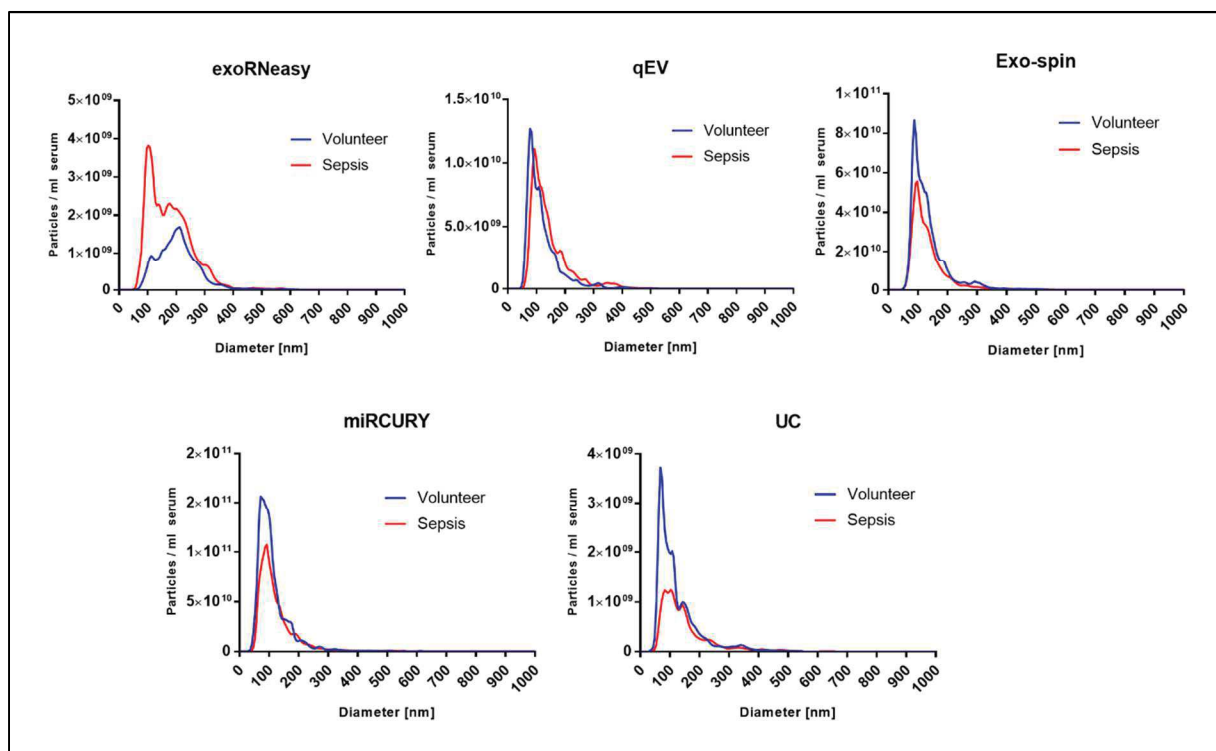


Abb. 8: Nanopartikel-Tracking-Analyse (NTA) für die fünf getesteten ECV-Isolationsverfahren.

Im TEM konnten mit allen vier verschiedenen Isolationsmethoden Moleküle nachgewiesen werden, die in Morphologie und Größe ECVs entsprechen (Abb. 9).

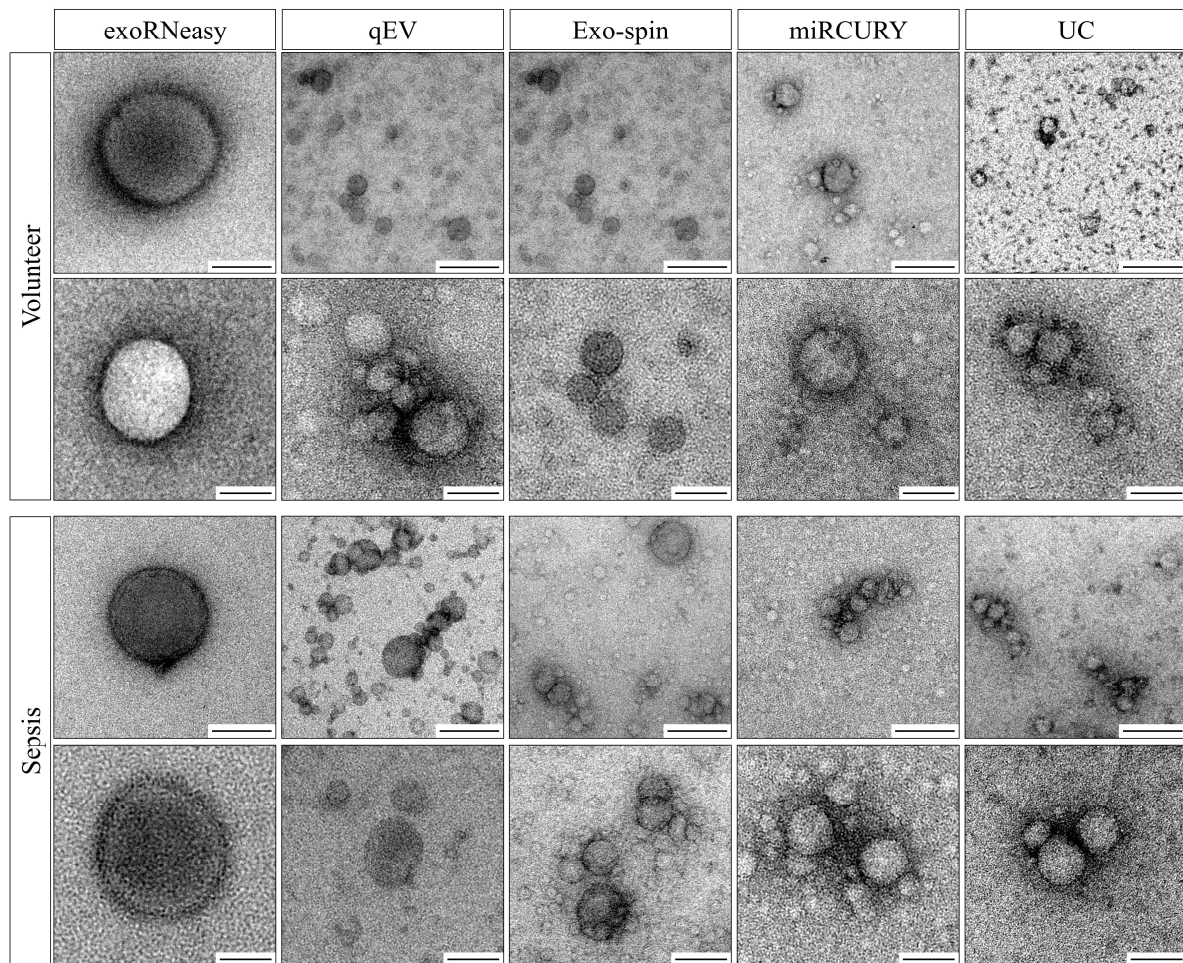


Abb. 9: Transmissions-Elektronenmikroskopie (TEM) von ECVs von gesunden Kontrollen und Sepsispatienten. Die Maßstabskala beträgt 250 nm (1. und 3. Reihe) bzw. 100 nm (2. und 4. Reihe).

Im Westernblot konnten die ECV-spezifischen Proteinmarker CD63 und Syntenin nach ECV-Isolation mittels Gelpermeation (Exo-spin, qEV), als auch mit Membranaffinität (Exo easy columns) detektiert werden, jedoch nicht nach Isolation der ECVs durch Präzipitation (miRCURY) oder Sedimentation (UC). Das breitverlaufende Bandenmuster des CD63-Markers weist auf unterschiedliche Glykosylierungsstufen des Proteins hin. Zwei weitere ECV-Marker, CD81 und TSG101 wurden bei keiner Isolationsmethode gefunden. Da bei allen ECV-Isolationen aus Blut die Gefahr der Co-Isolation von humanem Serumalbumin (HSA) besteht, wurden die Proben auf eine Verunreinigung mit HSA untersucht. Bei allen Isolationsmethoden wurde HSA nachgewiesen, jedoch bei der Sedimentation in geringster Menge. Zudem wurde auf die Negativmarker Argonaute 2 (Ago2) und Calnexin (CNX) getestet. CNX ist ein Protein des Endoplasmatischen Retikulums und weist auf eine Kontamination mit Zellfragmenten hin, was bei keiner der untersuchten Isolationsmethoden der Fall war. Ago2 ist ein im Blut zirkulierendes Transportprotein für RNA. Da gezielt nach einer ECV-Isolationsmethode gesucht wird, die eine nachgeschaltete miRNA-Sequenzierung aus ECVs erlaubt, wurde durch die Abwesenheit von Ago2 eine Kontamination mit anderer, im Blut vorhandener extrazellulärer RNA ausgeschlossen (Abb. 10).

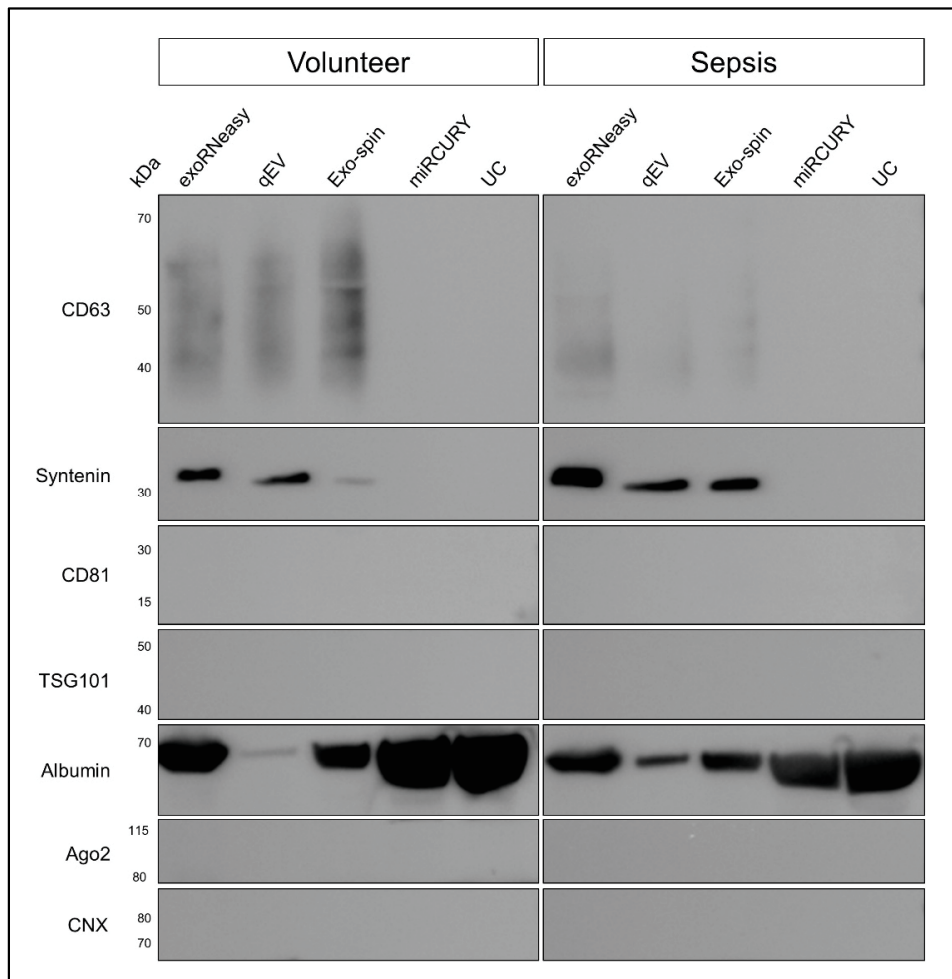


Abb. 10: Westernblot für die ECV-spezifischen Marker CD63, Syntenin, CD81, TSG101, sowie die Negativmarker Ago2, CNX und humanes Serumalbumin.

Da mit allen getesteten ECV-Isolationsverfahren erwiesenermaßen ECVs gewonnen werden konnten, wurde als nächstes aus diesen mittels kommerziellen Kits die Gesamt-RNA extrahiert. Die Konzentration und Längenverteilung der ECV-RNA wurde durch Kapillarelektrophorese (Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies)) bestimmt. Dieses Verfahren trennt auf einem Microchip die RNA-Moleküle in einer mit elektrischer Spannung versehenen Gelmatrix ihrer Größe nach auf, wobei kleine RNAs schneller durch die Gelporen migrieren. Die Berechnung der RNA-Konzentration erfolgt mit Hilfe eines standardisierten Größenmarkers (Ladder). Hinzugefügte Fluoreszenzfarbstoffe interkalieren mit den RNA-Molekülen, was mit einem Laser und der entsprechenden Software in Gelbild und Elektropherogramm translatiert wird. Hierbei zeigten sich sowohl bei der RNA-Ausbeute, als auch bei der Größenverteilung deutliche Unterschiede zwischen den getesteten ECV-Isolationsverfahren.

Die extrahierte exRNA der Sepsispatienten und gesunden Freiwilligen wurde für das SmallRNA-Seq vorbereitet und auf dem HiSeq2500 (Illumina Inc.) sequenziert. Die erhaltenen Daten wurden hinsichtlich kleiner RNAs bioinformatisch ausgewertet und einer differentiellen Genexpressionsanalyse (DGE) unterzogen, um bei Sepsispatienten signifikant regulierte exmiRNAs zu identifizieren.

Es zeigte sich, dass mit dem Präzipitationsverfahren (miRCURY) der höchste Anteil an miRNAs, bezogen auf die gesamt sequenzierte RNA, erzielt wurde (35 %/ 28 % für gesunde Freiwillige/Sepsispatienten), gefolgt vom Membranaffinitäts-Verfahren (exoRNeasy) (Abb. 11). Diese beiden Verfahren ergaben in der Sequenzierung auch absolut gesehen die höchste Anzahl an miRNAs, die dem humanen miRNA-Referenzprofil zugeordnet werden konnte.

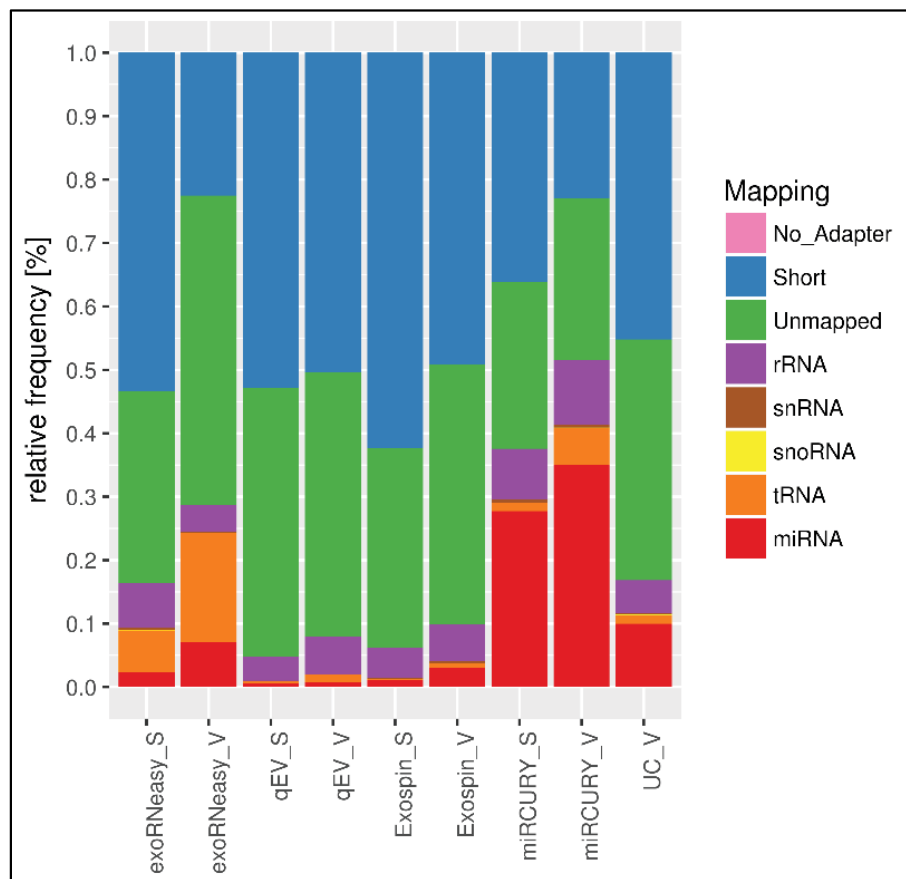


Abb. 11: Prozentuale Verteilung der gesamten, mittels NGS ermittelten RNA-Sequenzen auf ihre Subtypen (No_Adapter: ohne Sequenzieradapter; Short: Sequenz <15 nt; Unmapped: keiner der abgebildeten RNA-Subtypen zuordbar; rRNA: ribosomale RNA; snRNA: kleine nukleäre RNA; snoRNA: kleine nukleoläre RNA; tRNA: Transfer-RNA; miRNA: microRNA) für je gesunde Kontrollen (V) und Septiker (S).

Die DGE zeigte, dass die Anzahl differentiell regulierter miRNAs deutlich von der ECV-Isolationsmethode abhängt und es kaum Überschneidungen bezüglich spezifischer miRNAs gibt. Auch hier wurde für das Präzipitations- und das Membranaffinitätsverfahren (miRCURY bzw. exoRNeasy) die höchste Anzahl an differentiell regulierten miRNAs beim Vergleich der miRNA-Profile von Sepsispatienten mit gesunden Freiwilligen gefunden (Abb. 12).

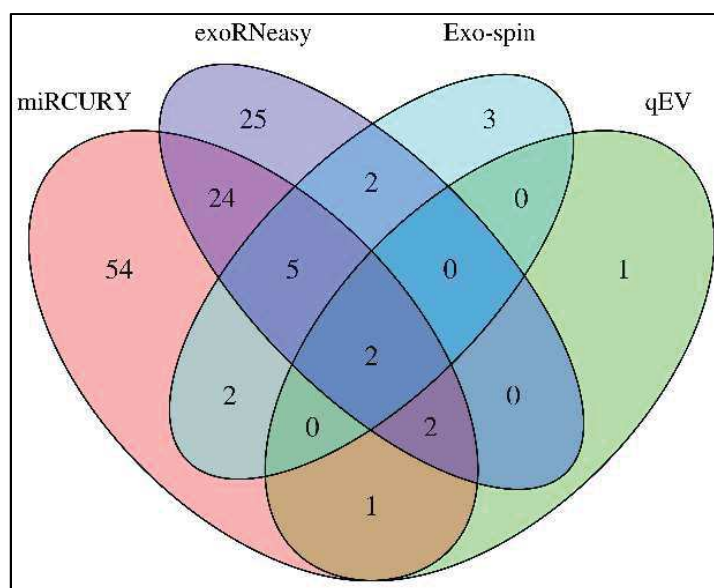


Abb. 12: Differentielle Genexpression (DGE) zeigt kaum Überschneidungen der miRNA-Profile zwischen den verschiedenen ECV-Isolationsverfahren. Das Präzipitations- und Membranaffinitätsverfahren (exoRNeasy) detektierten die höchste Anzahl an regulierten miRNAs mit 90 bzw. 60 miRNAs. Die Gelpermeationschromatographie (Exo-spin und qEV) ergab deutlich weniger regulierte miRNAs (14 bzw. 6 miRNAs).

Als Fazit lässt sich feststellen, dass alle getesteten kommerziellen ECV-Isolationsverfahren für Serum als Ausgangsmaterial im Vergleich zur zeitaufwendigen UC, dem Goldstandard, mindestens eine ebenso gute ECV-Isolation liefern. Für eine krankheitsspezifische miRNA Charakterisierung aus ECVs ist insbesondere ein Verfahren optimal, dass sowohl absolut als auch relativ die größtmögliche Anzahl an miRNAs aus ECVs hervorbringt. Diese Kriterien wurden sowohl mit dem Prinzip der Präzipitation (miRCURY) als auch mit der Membranaffinität (exoRNeasy) erreicht; da das letztere jedoch arbeitsintensiver ist und gesundheitsbedenkliche Chemikalien beinhaltet, ist das Präzipitationsverfahren folglich für die klinische Anwendung praktikabler^{4,5}.

Zelluläre, Serum- und exmiRNA-Profil bei Sepsispatienten

Das ausgewählte ECV-Isolationverfahren miRCURY wurde in einem nächsten Schritt an einer größeren Kohorte Sepsispatienten als repräsentatives Exempel kritisch kranker Patienten hinsichtlich krankheitsspezifischer miRNAs untersucht. Zudem wurde das exmiRNA-Profil mit dem zellulären und Serum-miRNA-Profil verglichen, um mögliche Profilunterschiede zu analysieren. Von 22 Sepsispatienten und 23 gesunden Freiwilligen (Kontrollen) wurde aus Serum bzw. Vollblut die exRNA, die gesamte Serum-, sowie die zelluläre RNA extrahiert. Je sieben Patienten mit septischem Schock und Kontrollen wurden einer SmallRNA-Seq unterzogen, um krankheitsspezifische miRNA-Biomarkerkandidaten zu identifizieren. Die Validierung erfolgte im restlichen Kollektiv mittels quantitativer real-time PCR (qPCR).

Im SmallRNA-Seq fanden sich 180 differentiell regulierte miRNAs, davon waren bei den Sepsispatienten 77 herab- und 103 hochreguliert. Die Mehrheit dieser miRNAs war zellulären Ursprungs (65% bzw. 62%). Der Anteil an herab- bzw. hochregulierten exmiRNAs betrug 14% bzw. 16%; für die Serum-miRNA je nur 4%. Nur 6 miRNAs (miR-423-5p, miR-122-5p, miR-27b-3p, miR-21-5p, miR7d-5p, miR7b-5p) fanden sich in allen drei Matrices wieder. Somit ergaben sich beim Vergleich der drei Matrices sowohl in der Anzahl differentiell regulierter miRNAs, als auch im miRNA-Profil deutliche Unterschiede.

Exemplarisch wurde ein Teil der im SmallRNA-Seq identifizierten krankheitsspezifischen miRNAs validiert. Als Ergebnis zeigte sich eine ähnlich effektive Validierungsrate für die drei Matrices mit 60-65%. Als Krankheitsindikator konnte von den validierten miRNAs die zelluläre miR-199b-5p mit hoher Konfidenz ($p < 0.001$) ermittelt werden. Die Überlebensrate der Patienten korrelierte hingegen mit dem Expressionslevel der exmiRNA miR-30a-5p, miR-125b-5p, sowie der gesamten Serum-miRNA miR-193a-5p (Abb. 13). Auch bei weiteren Korrelationen (z.B. mit Krankheitsstadium oder zeitlichem Krankheitsverlauf) fanden sich miRNAs als Biomarkerkandidaten aus allen drei Matrices (Abb. 14).

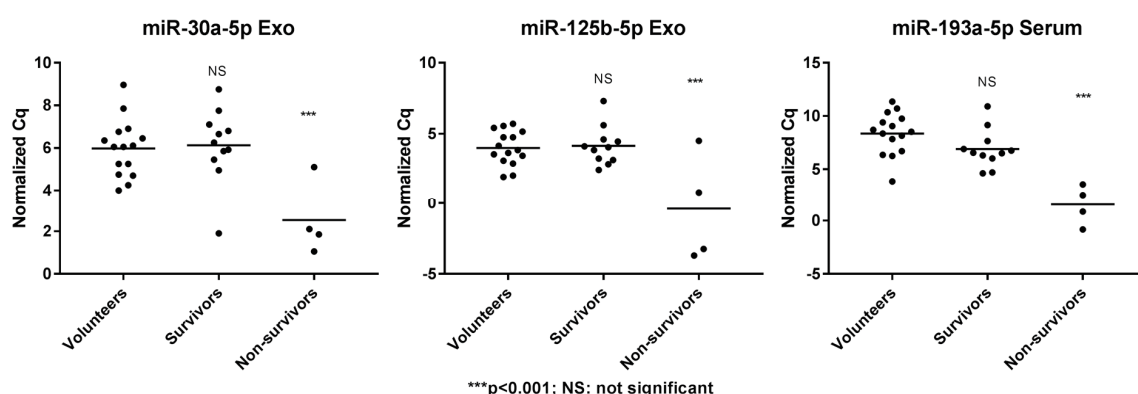


Abb. 13: Die qPCR-Validierung bestätigt eine signifikante Hochregulierung der drei gezeigten miRNAs für Patienten, die an der Sepsis verstarben im Vergleich zu wiedergenesenen Patienten.

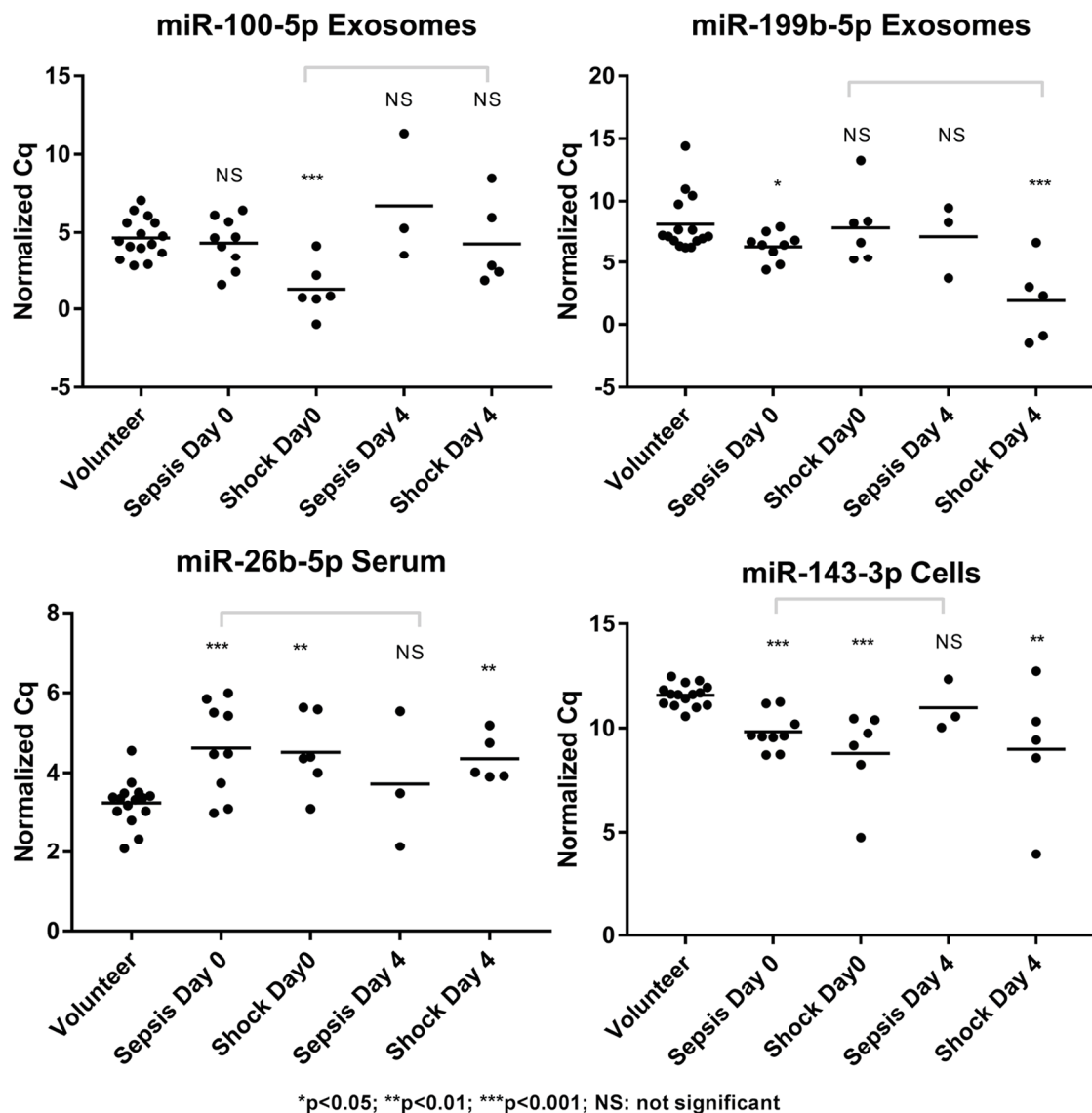


Abb. 14: Mittels qPCR validierte, signifikant regulierte miRNAs für Krankheitsstadium und zeitlichen Verlauf der Sepsis.

Folglich konnten die Untersuchungen zeigen, dass man bei der Suche nach robusten, krankheitsspezifischen miRNA-Biomarkerkandidaten alle drei möglichen miRNA-Herkunftsarten (zellulär, aus ECVs oder Serum) im Blut analysieren sollte, da die miRNA-Profile sich deutlich unterscheiden. Insbesondere wenn für bestimmte Fragestellungen keine signifikant regulierten zellulären miRNAs zu identifizieren sind, lohnt es sich das miRNA-Profil der ECVs zu analysieren, da ECVs als interzelluläres Kommunikationssystem oftmals krankheitsspezifische miRNAs transportieren¹⁷.

Einfluss des Anästhetikums auf das miRNA-Profil bei Patienten mit Kolonkarzinom-Resektion

Epidemiologische Daten weisen darauf hin, dass die Verwendung volatiler Anästhetika wie Sevofluran, im Vergleich zur total intravenösen Anästhesie (TIVA) mittels Propofol, bei der Tumoresektion mit einer erhöhten Sterblichkeit der Patienten im Langzeitverlauf assoziiert ist^{10,21,22}. Dieses Projekt

untersuchte daher die Hypothese, dass das volatile Narkotikum Sevofluran, im Vergleich zu Propofol, während einer Kolonkarzinom-Resektion zu einem abweichenden ECV-miRNA-Expressionprofil führt. Hierfür wurde jeweils vor und nach der Operation Serum von Patienten, die Sevofluran (n=9) bzw. Propofol (n=8) als Anästhetikum erhielten, gewonnen und aus den daraus extrahierten ECV-miRNAs ein SmallRNA-Seq durchgeführt.

Es zeigte sich, dass durch die Wahl des Anästhetikums das ECV-miRNA-Expressionprofil jeweils spezifisch beeinflusst wird (Abb. 15).

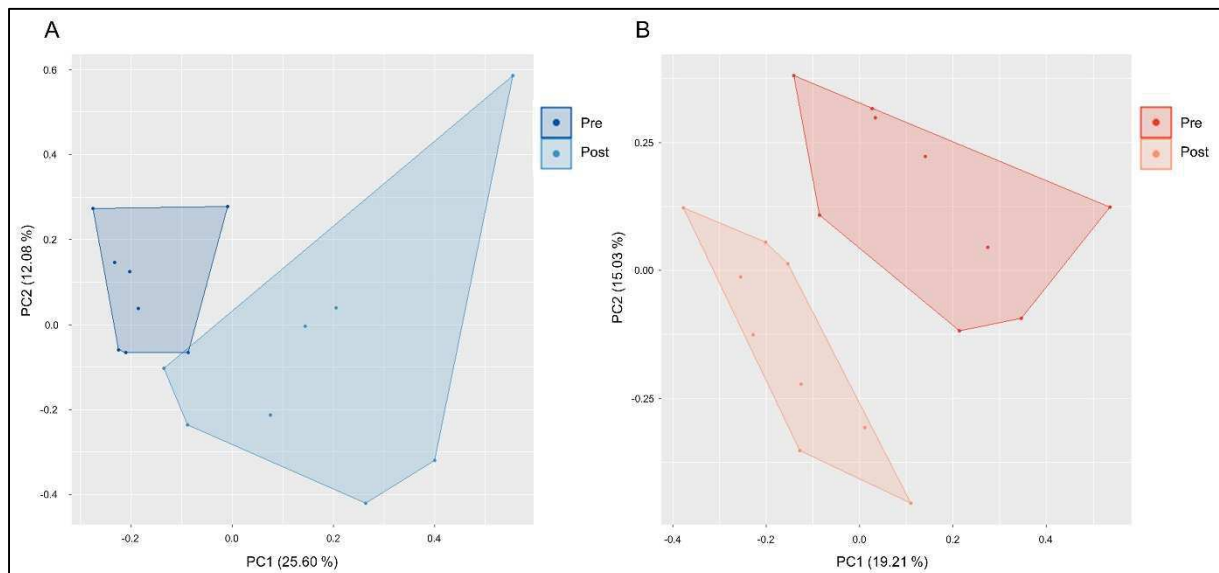


Abb. 15: Hauptkomponenten-Analyse der prä- und postoperativen miRNA-Expression von Patienten, die Propofol (A) oder Sevofluran (B) erhielten. Beide Narkoseformen induzierten deutliche Veränderungen des miRNA-Profiles.

Die differentielle Genexpressionsanalyse der ECV-miRNA-Profile (prä-OP und post-OP) für das jeweilige Anästhetikum ergab für Propofol 64 differentiell regulierte miRNAs (davon 48 hochreguliert; 16 herabreguliert) und für Sevofluran 33 differentiell regulierte miRNAs (davon 32 hochreguliert; 1 herabreguliert). Dabei waren alle post-OP herabregulierten miRNAs spezifisch für das jeweilige Anästhetikum, wohingegen sich die Mehrheit der hochregulierten miRNAs bei beiden Anästhetika wiederfanden (Abb. 16 und Tabelle 2).

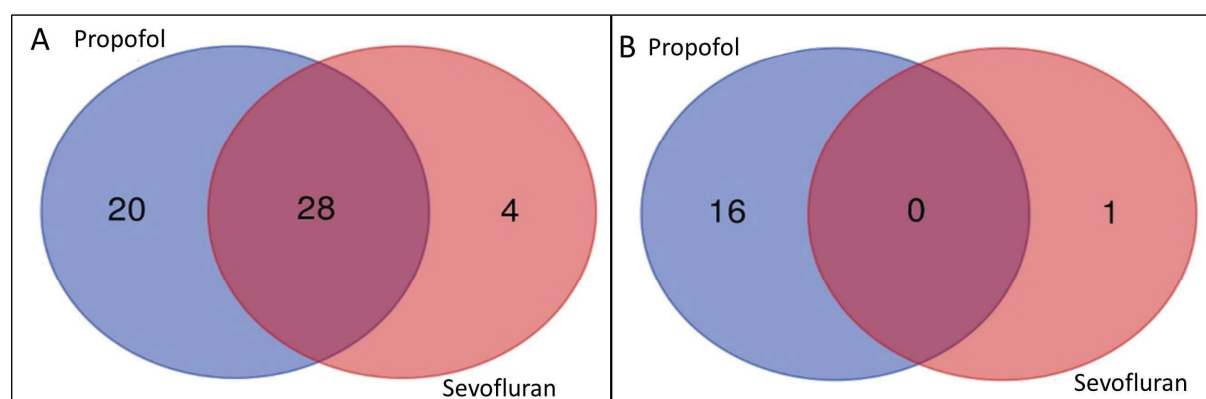


Abb. 16: Differentiell regulierte miRNAs. A: Signifikant hochregulierte miRNAs nach Tumorresektion. B: Signifikant herabregulierte miRNAs nach Tumorresektion.

Tabelle 2: ECV-miRNAs, die ausschließlich eine veränderte Expression beim Anästhetikum Propofol bzw. Sevofluran zeigten (* mittels RT-qPCR validiert).

Regulation	microRNA	Durchschnittliche microRNA Expression	Log2Fold Change	Adjustierter p-Wert
Propofol herabreguliert	miR-106a-5p	67.91	-1.55	8.98E-03
	miR-96-5p	51.96	-1.51	4.18E-04
	miR-15a-5p*	121.77	-1.45	1.95E-05
	miR-144-5p	395.48	-1.34	1.59E-04
	miR-652-3p	253.18	-1.21	1.47E-03
	miR-19b-3p*	412.83	-1.21	1.65E-03
	miR-15b-3p	202.01	-1.18	9.68E-06
	miR-103a-3p	2129.20	-1.14	9.23E-04
	miR-16-5p*	3861.74	-1.10	1.36E-04
	miR-501-3p	580.79	-1.08	1.09E-04
	miR-7-5p*	2610.65	-1.06	1.57E-06
	miR-17-5p*	491.99	-1.04	3.48E-03
	miR-185-5p*	21576.49	-1.03	2.95E-03
	miR-363-3p*	4662.80	-1.02	1.49E-04
	miR-598-3p	54.91	-1.00	8.98E-03
	miR-23a-3p	2314.70	-1.00	1.75E-02
Propofol hochreguliert	miR-206	2312.18	3.57	1.27E-20
	miR-205-5p*	51.95	2.80	3.36E-04
	miR-204-3p	58.93	2.13	1.42E-03
	miR-3168	1268.45	2.06	1.22E-02
	miR-1228-5p	241.73	1.80	2.80E-03
	miR-574-5p	68.30	1.73	3.53E-03
	miR-204-5p	57.70	1.55	1.47E-03
	miR-429	77.00	1.43	4.65E-03
	miR-193b-5p	122.32	1.41	2.06E-04
	let-7c-5p	1600.31	1.39	1.99E-04
	miR-4433b-3p	521.45	1.37	4.82E-03
	miR-125b-2-3p	58.73	1.32	1.20E-03
	miR-483-5p	101.04	1.30	3.55E-03
	miR-485-5p	152.11	1.26	9.26E-04
	miR-7706	261.90	1.17	2.44E-02
	miR-27b-3p	16969.53	1.15	7.77E-05
	miR-30a-3p	625.75	1.11	1.68E-05
	let-7b-3p	238.90	1.08	8.98E-03
	miR-499a-5p	347.89	1.08	1.03E-03
	miR-582-3p	826.73	1.07	3.43E-03
Sevofluran herabreguliert	miR-1246	410.41	-1.36	3.73E-08
Sevofluran hochreguliert	miR-335-3p	196.16	1.31	2.04E-04
	miR-10a-3p	69.29	1.17	2.22E-04
	miR-23b-5p	56.85	1.14	6.74E-03
	miR-335-5p*	242.73	1.02	9.82E-07

In einem nächsten Schritt wurde ermittelt, inwieweit diese differentiell exprimierten ECV-miRNAs eine Rolle bei Tumor-relevanten biologischen Funktionen und Signalwegen spielen. Hierfür wurden

diese in das *in silico* Programm Ingenuity Pathway Analysis (IPA®) eingelesen und eine Vergleichsanalyse durchgeführt. Das Ergebnis weist darauf hin, dass, im Gegensatz zu Sevofluran, Propofol-regulierte miRNAs inhibitorische Effekte auf Zellproliferation, -migration und die epithelial-mesenchymale Transition von Tumorzellen haben und zudem eine vermehrte Apoptose von Krebszellen fördern (Abb. 17).

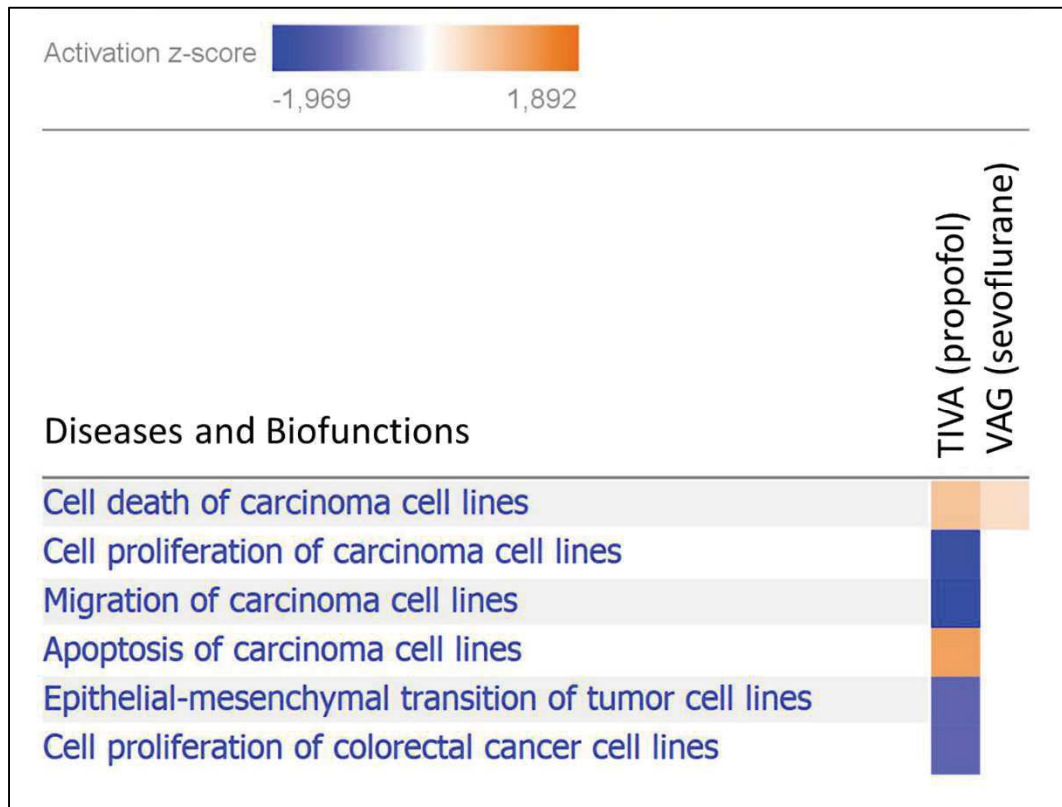


Abb. 17: Einfluss von Sevofluran bzw. Propofol regulierte ECV-miRNAs auf Tumor-relevante biologische Funktionen. Niedriger Z-Score (blau) zeigt eine Herabregulierung an; positiver Z-Score (orange) eine Hochregulierung.

Diese Studie konnte somit zeigen, dass Propofol und Sevofluran die ECV-miRNAs auf unterschiedliche Weise beeinflussen. Eine TIVA-basierte Anästhesie mittels Propofol scheint hierbei hemmende Effekte auf Signalwege zu haben, welche bei Tumorprogression und Metastasierung wirksam sind⁶.

4 Zusammenfassung und Ausblick

Die vorliegende Arbeit untersuchte zum einen die genregulatorische Wirkung von uORFs auf die Expression des Cannabinoid-, Gluko-, und Mineralokortikoidrezeptors in einem *in vitro* Stressmodell. Hierbei konnten bei zwei der fünf Cannabinoid-Splicevarianten, die zwei bzw. drei uORFs in der 5'UTR besitzen, funktionell wirksame uORFs nachgewiesen werden. Von den drei potentiellen uORFs des Glukokortikoidrezeptors führte das polymorphe uORF zu einer Proteinreduktion.

Zum anderen konnten die Untersuchungen zu TNBC mit Glukokortikoidrezeptor-Überexpression zeigen, dass das miRNA-Profil nur geringfügig durch den Glukokortikoidrezeptor beeinflusst wird und somit nicht primär ursächlich für die mit diesem TNBC-Typ assoziierte, erhöhte Therapieresistenz und Mortalitätsrate ist.

Die Untersuchungen bei Sepsis als Paradebeispiel einer schwerwiegenden Erkrankung zeigten, dass es zu signifikanten Expressionsänderungen von miRNAs bei septischen Patienten kommt. Zudem ließen sich einzelne miRNAs sogar mit der Schwere der Krankheit oder dem zeitlichen Verlauf korrelieren. Insbesondere konnte auch die Bedeutung von exmiRNAs als Biomarkerkandidaten gezeigt werden. Voruntersuchungen zum Vergleich verschiedener ECV-Isolationsmethoden deckten deutliche Unterschiede, die per se schon einen Einfluss auf das miRNA-Profil haben, auf.

Die Untersuchungen zum Einfluss der Anästhesieform (Propofol versus Sevofluran) auf das ECV-miRNA-Expressionsprofil während einer Kolonkarzinom-Resektion zeigten, dass das Anästhetikum das Profil spezifisch verändert. Die Ergebnisse weisen zudem darauf hin, dass ein Grund für die niedrigere Sterblichkeit der Patienten nach einer Kolonkarzinom-Resektion mittels Propofol auf Anästhesie-spezifischen miRNA-Expressionsänderungen beruhen könnte. Dadurch werden möglicherweise krebs- und metastasierungsfördernde Signalwege gehemmt, was sich schließlich positiv auf die Langzeitüberlebensrate dieser Krebspatienten auswirken könnte.

Da jede schwerwiegende Erkrankung des Organismus auf zellulärer Ebene eine Stressreaktion hervorruft, legen die Ergebnisse dieser Arbeit die Schlussfolgerung nahe, dass beide untersuchten genregulatorischen Elemente (uORFs und miRNAs) hierbei eine wesentliche Rolle einnehmen. Der genregulatorische Einfluss von signifikant veränderten miRNAs auf krankheitsrelevante Stoffwechselwege ist noch weitestgehend unbekannt. Daher werden in aktuell laufenden Untersuchungen von kritisch kranken Patienten (u. a. mit Sepsis, ARDS, Herz-Kreislauf) die mRNA-Profile mit differentiell exprimierten miRNA- und long noncoding RNA(lncRNA)-Profilen verglichen, um weitere mögliche miRNA/lncRNA-mRNA-Regulationsnetzwerke aufzudecken. Dies kann wiederum neue Ansätze für prognostische und diagnostische Marker sowie für die Entwicklung spezifischerer Therapeutika liefern.

5 Literaturverzeichnis

- [1] Bartel DP. MicroRNAs: Target recognition and regulatory functions. *Cell* 136: 215-233, 2009.
- [2] Batista PJ., Chang HY. Long noncoding RNAs: Cellular address codes in development and disease. *Cell* 152: 1298-1307, 2013
- [3] Buschmann D., Gonzalez R., Kirchner B., Mazzone C., Pfaffl MW., Schelling G., Steinlein OK., Reithmair M. Glucocorticoid receptor overexpression slightly shifts microRNA expression patterns in triple-negative breast cancer. *Int J Oncol* 52:1765-1776, 2018.
- [4] Buschmann D., Kirchner B., Hermann S., Märte M., Wurmser C., Brandes F., Kotschote K., Bonin M., Steinlein OK., Pfaffl MW., Schelling G., Reithmair M. Evaluation of serum extracellular vesicle isolation methods for profiling miRNAs by next-generation sequencing. *J Extracell Vesicles* 7: 1481321, 2018.
- [5] Buschmann D., Kirchner B., Hermann S., Märte M., Wurmser C., Brandes F., Kotschote K., Bonin M., Steinlein OK., Pfaffl MW., Schelling G., Reithmair M. Erratum: Evaluation of serum extracellular vesicle isolation methods for profiling miRNAs by next-generation sequencing. *J Extracell Vesicles* 8: 1581487, 2018.

- [6] Buschmann D., Brandes F., Lindemann A., Maerte M., Ganschow P., Chouker A., Schelling G., Pfaffl MW., Reithmair M. Propofol and sevoflurane differentially impact microRNAs in circulating extracellular vesicles during colorectal cancer resection: A pilot study. *Anesthesiology* 2019 [Epub ahead of print]
- [7] Calvo SE., Pagliarini DJ., Mootha VK. Upstream open reading frames cause widespread reduction of protein expression and are polymorphic among humans. *PNAS* 106: 7507-7512, 2009.
- [8] Chatterjee S., Pal JK. Role of 5' – and 3' – untranslated regions of mRNAs in human diseases. *Biol Cell* 101: 251-262, 2009.
- [9] Chen Z., Lan X., Wu D., Sunkel B., Ye Z., Huang J., Liu Z., Clinton SK., Jin VX., Wang Q. Ligand-dependent genomic function of glucocorticoid receptor in triple-negative breast cancer. *Nat Commun* 6: 8323, 2015.
- [10] Deng F., Ouyang M., Wang X., Yao X., Chen Y., Tao T., Sun X., Xu L., Tang J., Zhao L. Differential role of intravenous anesthetics in colorectal cancer progression: implications for clinical application. *Oncotarget* 7: 77087-77095, 2016
- [11] Eggert M., Pfob M., Schelling G., Steinlein OK. Upstream open reading frames regulate cannabinoid receptor 1 expression under baseline conditions and during cellular stress. *Mol Cell Endocrinol* 399: 103-109, 2015.
- [12] Lee YY., Cevallos RC., Jan E. An upstream open reading frame regulates translation of GADD34 during cellular stresses that induce elf2alpha phosphorylation. *J Biol Chem* 284: 6661-6673, 2009.
- [13] Lee Y., Andaloussi S., Wood MJ. Exosomes and microvesicles: extracellular vesicles for genetic information transfer and gene therapy. *Hum Mol Genet* 21: R125-134, 2012.
- [14] MacFarlane L., Murphy PR. MicroRNA: Biogenesis, function and role in cancer. *Curr Genomics* 11: 537-561, 2010.
- [15] Marceca C., Pfob M., Schelling G., Steinlein OK., Eggert M. Single nucleotide polymorphism creating a variable upstream open reading frame regulates glucocorticoid receptor expression. *Gene* 563:24-28, 2015.
- [16] Mueller PP., Hinnebusch AG. Multiple upstream AUG codons mediate translational control of GNC4. *Cell* 45: 201-207, 1986.
- [17] Reithmair M., Buschmann D., Märte M., Kirchner B., Hagl D., Kaufmann I., Pfob M., Chouker A., Steinlein OK., Pfaffl MW., Schelling G. Cellular and extracellular miRNAs are blood-compartment-specific diagnostic targets in sepsis. *J Cell Mol Med* 21: 2403-2411, 2017.
- [18] Rolle K., Piwecka M., Belter A., Wawrzyniak D., Jeleniewicz J., Barciszewska MZ., Barciszewski J. The sequence and structure determine the function of mature human miRNAs. *PloS One* 11: e0151246, 2016.
- [19] Valadi H., Ekstrom K., Bossios A., Sjostrand M., Lee JJ., Lotvall JO. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol* 9: 654-659, 2007.

[20] Vlassow AV., Magdaleno S., Setterquist R., Conrad R. Exosomes: current knowledge of their composition, biological functions, and diagnostic and therapeutic potentials. *Biochim Biophys Acta* 1820: 940-948, 2012.

[21] Wigmore TJ., Mohammed K., Jhanji S. Long-term survival for patients undergoing volatile versus iv anesthesia for cancer surgery: a retrospective analysis. *Anesthesiology* 124: 69-79, 2016

[22] Wu ZF., Lee MS., Wong CS., Lu CH., Huang YS., Lin KT., Lou YS., Lin C., Chang YC., Lai HC. Propofol-based total intravenous anesthesia is associated with better survival than desflurane anesthesia in colon cancer surgery. *Anesthesiology* 129: 932-942, 2018

6 Publikationsverzeichnis

Originalarbeiten als Erst- oder Letztautorenschaften

1. Buschmann D., Brandes F., Lindemann A., Maerte M., Ganschow P., Chouker A., Schelling G., Pfaffl MW., **Reithmair M.**
Propofol and sevoflurane differentially impact microRNAs in circulating extracellular vesicles during colorectal cancer resection. Anesthesiology 2019. doi: 10.1097/ALN.0000000000002986
2. Buschmann D., Kirchner B., Hermann S., Märte M., Wurmser C., Brandes F., Kotschote S., Bonin M., Steinlein OK., Pfaffl MW., Schelling G., **Reithmair M.**
Evaluation of serum extracellular vesicle isolation methods for profiling miRNAs by Next-Generation Sequencing. J Extracell Vesicles 2018. doi: 10.1080/20013078.2018.1481321
3. Buschmann D., Kirchner B., Hermann S., Märte M., Wurmser C., Brandes F., Kotschote S., Bonin M., Steinlein O.K., Pfaffl M.W., Schelling G., **Reithmair M.** *Erratum: Evaluation of serum extracellular vesicle isolation methods for profiling miRNAs by next-generation sequencing.* J Extracell Vesicles 2018. doi: 10.1080/20013078.2019.1581487
4. Buschmann D., Gonzalez R., Kirchner B., Mazzone C., Pfaffl MW., Schelling G., Steinlein O., **Reithmair M.**
Glucocorticoid receptor overexpression slightly shifts microRNA expression patterns in triple-negative breast cancer. Int J Oncol. 2018. doi:10.3892/ijo.2018.4336
5. **Reithmair M.**, Buschmann D., Märte M., Kirchner B., Hagl D., Kaufmann I., Pfob M., Chouker A., Steinlein OK., Pfaffl MW., Schelling G.
Cellular and extracellular miRNAs are blood-compartment-specific diagnostic targets in sepsis. J Cell Mol Med 2017. doi:10.1111/jcmm.13162
6. **Eggert M.**, Winterer G., Wanischek M., Hoda JC., Bertrand D., Steinlein O.
The nicotinic acetylcholine receptor alpha 4 subunit contains a functionally relevant SNP Haplotype. BMC Genet 2015. doi:10.1186/s12863-015-0204-1
7. Marceca C., Pfob M., Schelling G., Steinlein OK., **Eggert M.**
Single nucleotide polymorphism creating a variable upstream open reading frame regulates glucocorticoid receptor expression. Gene 2015. doi: 10.1016/j.gene.2015.03.015
8. **Eggert M.**, Pfob M., Jurinovic V., Schelling G., Steinlein OK.
Upstream open reading frames regulate cannabinoid receptor 1 expression under baseline conditions and during cellular stress. Mol Cell Endocrinol 2015. doi:10.1016/j.mce.2014.09.019
9. **Eggert M.**, Aichinger E., Pfaffl MW., Steinlein OK., Pfob M.
Nicotinic acetylcholine receptor subunits $\alpha 4$ and $\alpha 5$ associated with smoking behaviour and lung cancer are regulated by upstream open reading frames. PLoS One 2013. doi:10.1371/journal.pone.0066157
10. **Eggert M.**, Stüber E., Heurich M., Fredriksson-Ahomaa M., Burgos Y., Beutin L., Märtlbauer E.
Detection and characterization of Shiga toxin-producing Escherichia coli in faeces and lymphatic tissue of free-ranging deer. Epidemiol Infect 2013. doi:10.1017/S0950268812000246

Originalarbeiten als Koautor

1. Hermann S., Buschmann D., Kirchner B., Borrmann M., Brandes F., Kotschote S., Bonin M., Lindemann A., **Reithmair M.**, Schelling G., Pfaffl MW.
Transcriptomic profiling of cell-free and vesicular microRNAs from matched arterial and venous sera. J Extracell Vesicles 2019, doi: 10.1080/20013078.2019.1670935

2. Mehraein Y., Schmid I., **Eggert M.**, Kohlhase J., Steinlein OK.
DICER1 syndrome can mimic different genetic tumor predispositions. Cancer Lett 2016.
doi:10.1016/j.canlet.2015.11.002

Case reports

1. **Eggert M.**, Müller S., Heinrich U., Mehraein Y.,
A new familial case of microdeletion syndrome 10p15.3. Eur J Med Genet 2016.
doi:10.1016/j.ejmg.2016.02.008
2. Mehraein Y., Pfob M., Steinlein O., Aichinger E., **Eggert M.**, Bubendorff V., Mannhart A., Müller S. *2q37.3 Deletion Syndrome: Two Cases with Highly Distinctive Facial Phenotype, Discordant Association with Schizophrenic Psychosis, and Shared Deletion Breakpoint Region on 2q37.3.* Cytogenet Genome Res 2015. doi:10.1159/000431389

Sonstige Veröffentlichungen

1. Sattler EC., Ertl-Wagner B., Pellegrini C., Peris K., **Reithmair M.**, Schädle N., Ruzicka T., Steinlein OK. *Cutaneous melanoma in Birt-Hogg-Dubé syndrome: Part of the clinical spectrum?* (research letter) Br J Dermatol 2018. doi: 10.1111/bjd.15937
2. Korenke GC., **Eggert M.**, Thiele H., Nürnberg P., Sander T., Steinlein OK.
Nocturnal frontal lobe epilepsy caused by a mutation in the GATOR1 complex gene NPRL3. (brief communication) Epilepsia 2016. doi:10.1111/epi.13307
3. Tietze JK., Pfob M., **Eggert M.**, von Preußen A., Mehraein Y., Ruzicka T., Herzinger T.
A non-coding mutation in the 5' untranslated region of patched homologue 1 predisposes to basal cell carcinoma. (letter to the editor) Exp Dermatol 2013. doi: 10.1111/exd.12267
4. **Eggert M.**, Pfob M., Steinlein OK.
Melanocortin-3-receptor promoter polymorphism associated with tuberculosis susceptibility does not influence protein expression. (short report) BMC Res Notes 2013. doi:10.1186/1756-0500-6-99

7 Verzeichnis der relevanten Publikationen für die Habilitationsleistung

Eggert M., Pfob M., Jurinovic V., Schelling G., Steinlein OK.

Upstream open reading frames regulate cannabinoid receptor 1 expression under baseline conditions and during cellular stress. Mol Cell Endocrinol 2015. doi:10.1016/j.mce.2014.09.019

Marceca C., Pfob M., Schelling G., Steinlein OK., **Eggert M.**

Single nucleotide polymorphism creating a variable upstream open reading frame regulates glucocorticoid receptor expression. Gene 2015. doi: 10.1016/j.gene.2015.03.015

Buschmann D., Gonzalez R., Kirchner B., Mazzone C., Pfaffl MW., Schelling G., Steinlein O., **Reithmair M.**

Glucocorticoid receptor overexpression slightly shifts microRNA expression patterns in triple-negative breast cancer. Int J Oncol. 2018. doi:10.3892/ijo.2018.4336

Buschmann D., Kirchner B., Hermann S., Märte M., Wurmser C., Brandes F., Kotschote S., Bonin M., Steinlein OK., Pfaffl MW., Schelling G., **Reithmair M.**

Evaluation of serum extracellular vesicle isolation methods for profiling miRNAs by Next-Generation Sequencing. J Extracell Vesicles 2018. doi: 10.1080/20013078.2018.1481321

Buschmann D., Kirchner B., Hermann S., Märte M., Wurmser C., Brandes F., Kotschote S., Bonin M., Steinlein O.K., Pfaffl M.W., Schelling G., **Reithmair M.** *Erratum: Evaluation of serum extracellular vesicle isolation methods for profiling miRNAs by next-generation sequencing.* J Extracell Vesicles 2018. doi: 10.1080/20013078.2019.1581487

Reithmair M., Buschmann D., Märte M., Kirchner B., Hagl D., Kaufmann I., Pfob M., Chouker A., Steinlein OK., Pfaffl MW., Schelling G.

Cellular and extracellular miRNAs are blood-compartment-specific diagnostic targets in sepsis. J Cell Mol Med 2017. doi:10.1111/jcmm.13162

Buschmann D., Brandes F., Lindemann A., Maerte M., Ganschow P., Chouker A., Schelling G., Pfaffl MW., **Reithmair M.**

Propofol and sevoflurane differentially impact microRNAs in circulating extracellular vesicles during colorectal cancer resection. Anesthesiology 2019. doi: 10.1097/ALN.0000000000002986